

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

D
KONINKRIJK DER



PCT/NL 97 / 00624

NEDERLANDEN

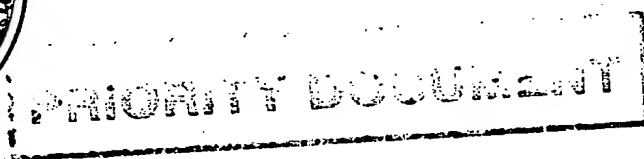
09/180150

Bureau voor de Industriële Eigendom



REC'D 06 JAN 1998

WIPO PCT



Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 15 november 1996 onder nummer 1004539,
ten name van:

STICHTING SCHEIKUNDIG ONDERZOEK NEDERLAND

te Den Haag en

STICHTING VOOR DE TECHNISCHE WETENSCHAPPEN

te Urecht

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Peptide afgeleid van een door auto-antilichamen van patiënten met reumatoïde artritis herkend
antigeen, antilichaam daartegen en werkwijze voor het detecteren van auto-
immuunantilichamen",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 1 december 1997.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

P.R.T.F. Tupan.

1004539

B. v. d. I. E.

22 NOV. 1996

UITTREKSEL

5 De uitvinding heeft betrekking op een peptide afgeleid van een door auto-antilichamen herkend antigeen, welk peptide reactief is met de auto-immuunantilichamen van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt. Het peptide volgens de uitvinding bezit een gemodificeerd arginine-residu. De uitvinding heeft tevens betrekking op antilichamen tegen het peptide en een werkwijze voor het detecteren van auto-immuunantilichamen. Licentieverlening mogelijk.

1004539

B. d. I. E.

22 NOV. 1996

NL 42924-A1/ho

Peptide afgeleid van een door auto-antilichamen van patiënten met reumatoïde artritis herkend antigeen, antilichaam daartegen en werkwijze voor het detecteren van auto-immuunantilichamen

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een peptide afgeleid van een door auto-antilichamen van patiënten met reumatoïde artritis herkend antigeen, welk peptide reactief is met van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstige auto-immuunantilichamen.

Een dergelijk peptide is bekend uit de Europese octrooiaanvraag 0 511 116 (Clonatec S.A.). In deze aanvraag wordt een antigeen beschreven dat een fragment van filaggrine of profilaggrine omvat. Het peptide wordt herkend door auto-immuunantilichamen die specifiek zijn voor reumatoïde artritis. Reumatoïde artritis (RA) is een systemische auto-immuunziekte. Het is de meest voorkomende gewrichtsontstekingsziekte, is chronisch en kan leiden tot vergaande lichamelijke ongeschiktheid.

De onderhavige uitvinding beoogt een peptide te verschaffen dat reactief is met van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstige auto-immuunantilichamen, welk peptide geschikt is voor diagnostisch onderzoek met verhoogde specificiteit en tevens bruikbaar is voor verdere doelen zoals het verkrijgen (opwekken, selecteren en isoleren) van poly- en monoklonale antilichamen.

Hiertoe wordt het peptide volgens de uitvinding gekenmerkt doordat het afgeleide, met auto-immuunantilichamen reactieve peptide correspondeert met een een codon voor een arginine-residu bevattend deel van een voor het antigeen coderend mRNA-molecuul, en het arginine-residu in het afgeleide, met auto-immuunantilichamen reactieve peptide een gemodificeerd arginine-residu is.

Het peptide volgens de uitvinding dat een gemodificeerd arginine-residu bezit is op verrassenderwijze zeer geschikt gebleken voor de specifieke diagnose van reumatoïde artritis.

Er is voor RA tot op heden geen specifieke serologi-

sche test beschikbaar. De enige test die vaak wordt gebruikt berust op het bepalen van reumafactoren (RF; ref. 1) welke bij 70% van de RA-patiënten worden aangetroffen. Echter, deze test is weinig specifiek en kenmerkt zich door een relatief
 5 hoog aantal vals-positieven. Van patiënten die aan systemische lupus erythematosus lijden is het percentage vals-positieven circa 20%, en bij gezonde individuen circa 5%.

Bij voorkeur wordt het peptide gekenmerkt doordat het gemodificeerde arginine-residu een zijketen bezit met
 10 formule I van het formuleblad, waarbij

$$X = \text{NH}_2, \text{CH}_3, \text{NHCH}_3 \text{ of } \text{N}(\text{CH}_3)_2;$$

$$Y = \text{O}, \text{NH}, \text{NHCH}_3 \text{ of } \text{N}(\text{CH}_3)_2;$$

$$Z = \text{O}, \text{NH} \text{ of } \text{CH}_2; \text{ en}$$

$$n = 2, 3 \text{ of } 4, \text{ onder de voorwaarde dat wanneer } X =$$
 15 NH_2 en $Z = \text{NH}$, Y geen NH is; en in het bijzonder is het gemodificeerde arginine-residu een citrulline-residu. Voor citrulline is $X = \text{NH}_2$, $Y = \text{O}$, $Z = \text{NH}$ en $n = 3$.

Een peptide dat de voorkeur geniet is het peptide gekozen uit de groep van peptiden met de formule II, III en
 20 IV van het formuleblad.

Zo kan met het peptide met de formule II bij circa 36% van de patiënten die lijden aan reumatoïde artritis worden vastgesteld dat zij daaraan lijden en is bij andere auto-immuunziekten en gezonde individuen het aantal vals
 25 positieven minder dan 2%.

Volgens een gunstige uitvoeringsvorm is het peptide een cyclisch peptide, bijvoorbeeld door aanwezigheid van een cystine-residu.

Een dergelijk cyclisch peptide vertonen in sommige
 30 gevallen een verhoogde immunologische affiniteit.

Bij voorkeur is het cyclische peptide het peptide met de formule V van het formuleblad.

Bij voorkeur is het peptide een synthetisch peptide.

Door middel van organische synthese kan het reactie-
 35 ve peptide volgens de uitvinding in grote hoeveelheden zuiver worden verkregen, hetgeen het op grote schaal immunologisch testen mogelijk maakt.

Volgens een alternatieve uitvoeringsvorm wordt het peptide volgens de uitvinding gekenmerkt doordat het peptide

is verkregen door het proteolytisch behandelen van (pro)filaggrine, scheiding van door proteolyse gevormde peptidefragmenten en gevolgd door selectie op de aanwezigheid van een gemodificeerd arginine-residu in een bij de proteolytische behandeling gevormd peptide.

Aldus kunnen peptiden worden geïdentificeerd waarmee de gevoeligheid van een test op reumatoïde artritis kan worden verhoogd. Onder gevoeligheid wordt in de onderhavige aanvraag verstaan het vermogen van een test een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt als zodanig te identificeren.

Volgens een gunstige uitvoeringsvorm is het antigeen (pro)filaggrine, en is het peptide reactief met van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstige auto-immun-antilichamen reactief met (pro)filaggrine.

Het is gebleken dat het peptide zeer geschikt is voor het met hoge specificiteit (weinig vals-positieven) testen op reuma.

De onderhavige uitvinding heeft tevens betrekking op een antilichaam kruisreactief met een antilichaam opgewekt tegen een peptide volgens de uitvinding.

Een dergelijk antilichaam is bruikbaar voor het aantonen van reumatoïde artritis met behulp van coupes van biopten en immunologische testen van het sandwich-type.

Bij voorkeur is het antilichaam een monoklonaal antilichaam.

Volgens een verdere voorkeursuitvoeringsvorm is het antilichaam verkregen onder gebruikmaking van een peptide volgens de uitvinding als antigeen.

Een geschikt antilichaam volgens de uitvinding wordt gekenmerkt doordat het kruisreactief is met het antilichaam zoals dat wordt geproduceerd door Escherichia coli TG1 met plasmide RA3, gedeponeerd bij het Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Nederland, onder aanwinstnummer CBS143.96

Tenslotte heeft de uitvinding betrekking op een werkwijze voor het detecteren van auto-immunantilichamen tegen reumatoïde artritis.

De werkwijze volgens de uitvinding wordt gekenmerkt doordat ten minste één immunologisch reactief molecuul geko-

zen uit de groep bestaande uit een peptide volgens de uitvinding en een antilichaam volgens de uitvinding, in een immunologische test wordt toegepast.

5 Naast een verhoogde gevoeligheid worden verdere voordelen bereikt, in het bijzonder een betere reproduceerbaarheid, kwantitatieve informatie en betere bruikbaarheid voor prognostische toepassingen.

De uitvinding zal thans worden toegelicht aan de hand van het volgende voorbeeld.

10 Materiaal en methoden.

Peptide synthese: Peptiden werden geselecteerd voor synthese op basis van aminozuurvolgorden afgeleid van bekende cDNA-volgorden van menselijk profilaggrine (ref. 2; ref. 3). De peptiden werden op een vaste fase gesynthetiseerd onder
15 gebruikmaking van de werkwijze beschreven door Schellekens et al. (ref. 4). De peptiden waren voor ten minste 95% zuiver, zoals bepaald aan de hand van het elutiepatroon met behulp van reversed phase chromatografie en de relatieve absorptie bij 214 nm. De samenstelling van de peptiden werd bevestigd
20 met behulp van massa-spectrometrie (MALDI-MS). Alle peptiden werden gesynthetiseerd als peptide-amiden.

TABEL 1
Gesynthetiseerde peptiden

5 De peptiden waarvan de naam begint met "cf" zijn op basis van het C-eindstandige uiteinde (aminozuren 306-324); en de peptiden waarvan de naam begint met "nf" zijn gebaseerd op de volgorde nabij het N-eindstandige uiteinde (aminozuren 18-32 voor nfc1). Aminozuurvolgorden op basis van cDNA van een
10 profilaggrine-repeat.

naam	peptide volgorde*
cfc1	S H Q E S T <u>X</u> G R S R G R S G R S G S
cfc2	S H Q E S T R G <u>X</u> S R G R S G R S G S
cfc3	S H Q E S T R G R S <u>X</u> G R S G R S G S
cf	S H Q E S T R G R S R G R S G R S G S
cfA	S H Q E S T A G R S R G R S G R S G S
cfE	S H Q E S T E G R S R G R S G R S G S
cfQ	S H Q E S T Q G R S R G R S G R S G S
nfc1	T G P S T R G R Q G S <u>X</u> H E
nf	E S S H G W T G P S T R G R Q G S R H E

* (A = alanine; G = glycine; H = histidine; E = glutamine-zuur; P = proline; R = arginine; Q = glutamine; S = serine; T = threonine; W = tryptofaan; X = citrulline)

25 Detectie met behulp van ELISA.

De peptiden werden covalent gekoppeld via een N-oxysuccinimide-opppervlak aan de putjes van microtiter platen met 96 putjes (Costar amide-bindingsplaten) in een hoeveelheid van 1 µg/putje. Het koppelen geschiedde gedurende 16 uur bij 4°C en
30 pH 9,0. De platen werden gedurende 1 uur geblokt met 2% runderserumalbumine. De sera werden 200-voudig verdund in een verdunningsoplossing (0,3% BSA, 350 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 vol.%/vol.% Triton X-100, 0,5 % gew.%/vol.% Na-desoxycholaat, 0,1% SDS) aangevuld met 10% normaal konijnen-serum, en gedurende 1 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd.
35 Na wassen van de platen (3 keer met PBS met 0,05 vol.% Tween-®20), werd 100 µl anti-humaan IgG geconjugeerd met peroxidase (Dako P214), 1000 keer verdund in verdunningsbuffer, aan de putjes toegevoegd. Na gedurende 1 uur incuberen bij kamertem-
40 peratuur werden de platen 3 keer gewassen met PBS/Tween®20, en gebonden antilichamen werden gedetecteerd met tetramethylbenzidine als substraat. De reactie werd na 10 minuten gestopt door het toevoegen van 100 µl 2 M zwavelzuur per putje.

Uitlezen geschiedde bij 450 nm. Sera met een OD₄₅₀ van 0,2, na aftrekken van de blanco voor het betreffende serum (een putje waarbij geen peptide was gekoppeld), werden als positief beschouwd.

5 Resultaten.

De resultaten zijn samengevat in tabel 2. In het totaal werd sera van 288 patiënten met reumatische aandoeningen gebruikt, waarvan 132 afkomstig van patiënten die leden aan reumatoïde artritis.

10

TABEL 2

Resultaten met peptide cfc1 (formule I van het formuleblad).

Serumomschrijving	n	aantal positieve sera %
RA(RF+)	109	42 (39%)
RA(RF-)	23	6 (26%)
15 reumatische aandoeningen anders dan RA	156	2 (1,3%)
systemische lupus erythematosus	50	1
20 primair syndroom van Sjögren	35	0
25 polymyositis/dermato- myositis	26	0
Gezonde individuen	59	0

30

Van de in het totaal 132 sera van patiënten die lijden aan reumatoïde artritis waren 48 positief met het peptide cfc1 (formule I van het formuleblad). Derhalve was de gevoeligheid met peptide cfc1 36% (48/132). Sera waren eveneens reactief met de peptiden cfc2 en cfc3 met percentages
 35 van respectievelijk 18% (24/132) en 26% (35/132). Van de 24 sera reactief met cfc2 waren 13 sera niet reactief met cfc1. Het peptide cfc2 verbetert dus de gevoeligheid van de test met 10%. Van de 35 sera reactief met cfc3 waren geen sera die niet reactief waren met cfc1 en cfc2. Peptide cfc3 draagt dus
 40 bij gebruik in combinatie met cfc1 en cfc2 niet bij tot een verhoogde gevoeligheid van de test. Bij deze percentages wordt opgemerkt dat deze afhankelijk zijn van de door aanvraagster aangelegde drempelwaarde voor de specificiteit. Dezelfde meetgegevens (uit de ELISA-experimenten) kunnen

worden geïnterpreteerd als een gevoeligheid van ca. 50-60% door te kiezen voor een iets geringere specificiteit, welke overigens nog steeds veel beter is dan met de bekende reumafactortest (ref. 1) kan worden bereikt.

5 Sera van patiënten lijdend aan diverse infectieziekten (borrhelia, syfilis, malaria, endocarditis, legionella, tuberculose, mycoplasma, chlamydia, yersinia, salmonella, parvovirus B19, Epstein-Barr virus, rubella, schistosomiasis, toxoplasma, leismaniasis, Chagas) werden getest op de aanwezigheid van antilichamen reactief met cfcl. Van de 308 geteste sera waren er 9 positief. De specificiteit was derhalve 97%, een aanmerkelijke verbetering ten opzichte van de RF-test.

15 Varianten van cfcl waarbij citrulline werd vervangen door een neutraal (alanine; cfA), zuur (glutaminezuur; cfE) of amide (glutamine; cfQ) residu bleken niet immunologisch reactief te zijn. Hetzelfde geldt voor het controle peptide cf, dat geen gemodificeerd arginine-residu bezit.

20 Een cyclische variant (met de formule V van het formuleblad, waarin twee cysteine residuën (C) middels een zwavelbrug zijn verbonden) van cfcl werd met behulp van de hierboven beschreven ELISA getest op 132 RA sera. Deze cyclische variant bleek reactief te zijn met 83 sera (63%), hetgeen een verhoging van de gevoeligheid betekent. Van de 156 sera van aan andere reumatische aandoeningen dan RA lijdende patiënten bleken er 5 positief (specificiteit 97%). Geen enkel serum van 50 gezonde individuen was positief.

25 Een tweede citrulline gesubstitueerd peptide (nfc1) bleek specifiek reactief met 10% van de RA sera te zijn, maar niet met het controle peptide nf dat geen citrulline bezit. Van de met nfc1 reactieve RA sera waren de meeste niet reactief met cfcl. Derhalve kan de gevoeligheid van een test op reumatoïde artritis worden verhoogd door het toepassen van meer peptiden met een gemodificeerd arginine-residu.

35 Vanzelfsprekend kunnen er meer gemodificeerde arginine-residuen in een peptide aanwezig zijn maar kan het peptide anderzijds ook een of meer niet-gemodificeerde arginine-residuen bezitten.

Aanvraagster houdt het voor mogelijk dat bij andere

auto-immuunziekten eveneens gemodificeerde aminozuren, in het bijzonder die afgeleid van arginine-residuen, een rol spelen bij auto-immuunziekten. Derhalve is de uitvinding tevens gericht op peptiden met gemodificeerde aminozuren welke

5 reactief zijn met auto-antilichamen afkomstig van patiënten lijdend aan andere auto-immuunziekten dan reumatoïde artritis.

REFERENTIES.

- 1) Smolen, J.S., (1996) Autoantibodies in rheumatoid arthritis,
in Manual of biological markers of disease (W.J. van
5 Venrooij en R.N. Maini, red.) deel C Hoofdstuk 1.1 blz. 1-
18. Kluwer Scientific Publishers, Dordrecht.
- 2) McKinley-Grant, L.J., Idler, W.W., Bernstein, I.A., Parry,
D.A.D., Cannizzaro, L., Croce, C.M., Huebner, K., Lessin,
10 S.R. & Steinert, P.M. (1989) Characterization of a cDNA
clone encoding human filaggrin and localization of the
gene to chromosome region 1q21.
Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. 86,
4848-4852.
- 15 3) Gan, S.Q., McBride, O.W., Idler, W.W., Nedialka, M. &
Steinert, P.M. (1990) Organization, structure, and poly-
morphisms of the human profilaggrin gene.
Biochemistry 29, 9432-9440.
- 20 4) Schellekens, G.A., Lasonder, E., Feijlbrief, M., Koedijk,
D.G.A.M., Drijfhout, J.W., Scheffer, A.J., Welling-Wester,
S & Welling, G.W. (1994) Identification of the core resi-
25 dues of the epitope of a monoklonal antibody raised
against glycoprotein D of herpes simplexvirus 1 by scree-
ning of a random peptide library.
The European Journal of Immunology 24, 3188-3193.

CONCLUSIES

1. Peptide afgeleid van een door auto-antilichamen van patiënten met reumatoïde artritis herkend antigeen, welk peptide reactief is met van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstig auto-immuunantilichamen, met het kenmerk, dat het afgeleide, met auto-immuunantilichamen reactieve peptide correspondeert met een een codon voor een arginine-residu bevattend deel van een voor het antigeen coderend mRNA-molecuul, en het arginine-residu in het afgeleide, met auto-immuunantilichamen reactieve peptide een gemodificeerd arginine-residu is.

2. Peptide volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat het gemodificeerde arginine-residu een zijketen bezit met formule I van het formuleblad, waarbij

$X = \text{NH}_2, \text{CH}_3, \text{NHCH}_3 \text{ of } \text{N}(\text{CH}_3)_2;$

$Y = \text{O}, \text{NH}, \text{NHCH}_3 \text{ of } \text{N}(\text{CH}_3)_2;$

$Z = \text{O}, \text{NH} \text{ of } \text{CH}_2;$ en

$n = 2, 3 \text{ of } 4$

onder de voorwaarde dat wanneer $X = \text{NH}_2$ en $Z = \text{NH}$, Y geen NH is.

3. Peptide volgens conclusie 1 of 2, met het kenmerk, dat het gemodificeerde arginine-residue een citrulline-residu is.

4. Peptide volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het peptide is gekozen uit de groep van peptiden met de formule II, III en IV.

5. Peptide volgens één van de conclusies 1 tot 3, met het kenmerk, dat het peptide een cyclisch peptide is.

6. Peptide volgens conclusie 5, met het kenmerk, dat het cyclische peptide de formule V heeft.

7. Peptide volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het peptide een synthetisch peptide is.

8. Peptide volgens één der voorgaande conclusies, met het kenmerk, dat het antigeen (pro)filaggrine is, en het peptide reactief is met van een aan reumatoïde artritis lijdende patiënt afkomstig auto-immuunantilichamen reactief met (pro)filaggrine.

9. Peptide volgens één van de conclusies 1 tot 6, met het kenmerk, dat het peptide is verkregen door het proteolytisch behandelen van het antigeen, scheiding van door proteolyse gevormde peptidefragmenten en gevolgd door selectie op de aanwezigheid van een gemodificeerd arginine-residu in een bij de proteolytische behandeling gevormd peptide.

10. Antilichaam kruisreactief met een antilichaam opgewekt tegen een peptide volgens één van de conclusies 1 tot 9.

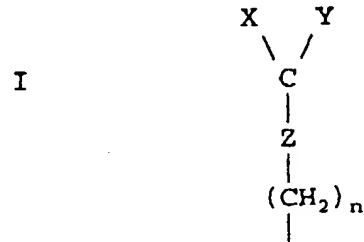
11. Antilichaam volgens conclusie 10, met het kenmerk, dat het antilichaam een monoklonaal antilichaam is.

12. Antilichaam volgens conclusie 10 of 11, met het kenmerk, dat het antilichaam is verkregen onder gebruikmaking van een peptide volgens één van de conclusies 1 tot 9 als antigeen.

13. Antilichaam volgens één van de conclusie 9 tot 12, met het kenmerk, dat het kruisreactief is met het antilichaam zoals dat wordt geproduceerd door Escherichia coli TG1 met plasmide RA3, gedeponeerd bij het Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, Nederland, onder aanwinstnummer CBS143.96.

14. Werkwijze voor het detecteren van auto-immuunantilichamen, met het kenmerk, dat ten minste één immunologisch reactief molecuul gekozen uit de groep bestaande uit een peptide volgens één van de conclusies 1 tot 9 en een antilichaam volgens één van de conclusies 10 tot 13, in een immunologische test wordt toegepast.

1004539

FORMULEBLAD

II S H Q E S T X G R S R G R S G R S G S

III S H Q E S T R G X S R G R S G R S G S

IV S H Q E S T R G R S X G R S G R S G S

V H Q C H Q E S T X G R S R G R C G R S G S

└────────────────────────────────────────┘